

吸光光度法-イオンクロマトグラフ法の併用による ミネラルウォーター類中のシアン類分析法の妥当性確認

細木伸泰*¹ 折原智明 江湖正育 宮本啓二*² 木田 潔

要 旨

平成 26 年 12 月 22 日付け厚生労働省告示第 482 号により食品、添加物等の規格基準(昭和 34 年厚生省告示第 370 号。以下「告示」という。)が改正され、清涼飲料水におけるミネラルウォーター(MW)類を「MW 類(殺菌・除菌無)」と「MW 類(殺菌・除菌有)」に区分し、それぞれに規格基準を設定し、成分規格が規定された¹⁾。また、これらの成分規格に係る分析法が定められた旨、同日付けで通知²⁾があった。

規定された MW 類の成分規格のうち、シアン化物イオン(CN⁻)及び塩化シアン(C1CN)分析法については、イオンクロマトグラフ-ポストカラム吸光光度法(IC-PC 法)が示されたが、札幌市衛生研究所では分析に必要な機器が整備されておらず、採用できなかった。このため、所内の機器で検査可能な方法である、4-ピリジンカルボン酸-ピラゾロン吸光光度法(4-PP 法)を一部変更した方法とイオンクロマトグラフ直接法(IC 法)を併用した分析法(以下「併用法」という。)を検討した。

併用法について「食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドライン」³⁾(以下「ガイドライン」という。)に従い妥当性確認を行ったところ、良好な結果が得られた。

1. 緒 言

平成 26 年 12 月 22 日付け厚生労働省告示第 482 号により告示が改正され、清涼飲料水の規格基準において、MW 類を「MW 類(殺菌・除菌無)」と「MW 類(殺菌・除菌有)」に区分し、それぞれに規格基準を設定し、成分規格が規定された¹⁾。これらの成分規格は、従前は製造基準のうち原水基準として設定されていた化学物質等であり、殺菌・除菌無の MW 類については重金属類を含む 14 項目が、殺菌・除菌有の MW 類については前述の 14 項目に有機化学物質、消毒副生成物等を加えた 39 項目が規定された。

食品化学係では、MW 類を含む清涼飲料水について、従前から成分規格検査を実施してきたことから、このたびの規格改正に伴い増加した MW 類の成分規格項目についても、保健所収去部門から検査

要望を受けた。成分規格等の検査に用いる分析法は、告示や通知等で示された、いわゆる「公定法」を用いることが基本となる。しかしながら、MW 類の公定法は、当係では整備されていない機器を用いる分析法も多い。このため、公定法に基づく MW 類の成分規格検査を実施するには、分析機器を所有している所内の他検査部門と機器を共用するか、所内の設備で分析可能な方法を開発する必要がある。ただし、機器を共用する場合は、当該機器を食品衛生検査用の機器として管理すること、新たに分析法を開発する場合は、分析法がガイドラインに適合することを確認(妥当性確認)することが要件となる。

新たに設定された規格基準のうち、CN⁻及び C1CN については、通知にて IC-PC 法が示された。この方法を用いるためには、ポストカラム付きイオン

*1 現保健所環境衛生課 *2 前生活科学課長

クロマトグラフが必要となるが、当所では当該機器は未整備であった。また、当該機器は現状、食品分野にて汎用的に用いる機器となる見込もなく、限られた予算の中で優先的に整備することも難しかった。このことから、当所で整備されている機器で検査可能な分析法として、上水試験方法に収載されている 4-PP 法⁴⁾を一部変更した方法(以下「4-PP 変法」という。)と、IC 法を組合せた併用法を検討した。この併用法について、ガイドラインに基づく妥当性確認を行い、良好な結果を得たので報告する。

2. 方 法

2-1 試料

市販の MW 類(殺菌・除菌無)を用いた。

2-2 試薬及び標準液

(1) 試薬

リン酸二水素カリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸一ナトリウム、リン酸、1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン、*p*-ジメチルアミノベンジリデンローダニン、水酸化ナトリウム、シアン化カリウム、クロラミン T は和光純薬(株)製または関東化学(株)製試薬特級グレードを、*N,N*-ジメチルホルムアミドは関東化学(株)製 HPLC 用グレードを、4-ピリジンカルボン酸ナトリウムは和光純薬(株)製シアン測定用グレードを、アセトンは和光純薬(株)製残留農薬用グレードを、0.1mol/L 硝酸銀溶液は和光純薬(株)製容量分析用グレードを、0.1mol/L チオシアン酸カリウム溶液は関東化学(株)製容量分析用グレードを用いた。標準液の調製等に用いる水は、超純水を 5℃に冷却し、冷却水とした。

(2) 調製試液類

- ① 20%リン酸二水素カリウム溶液：リン酸二水素カリウム 20g を水に溶かして 100mL としたものをを用いた。
- ② リン酸緩衝液(pH7.2)：リン酸水素二ナトリウム 35.6g を水約 600mL に溶かし、20%リン

酸二水素カリウム溶液を加えて pH を 7.2 に調整した後、水で 1L とし、冷却したものをを用いた。

- ③ 1mol/L リン酸緩衝液：リン酸一ナトリウム 31.2g を約 150mL の水に溶解し、リン酸 6.8mL を加えた後、水で 200mL とし、冷却したものをを用いた。
- ④ 4-ピリジンカルボン酸-ピラゾロン溶液：1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン 3.0g を 200mL の *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解した後、4-ピリジンカルボン酸ナトリウム 17.0g を水約 300mL に溶解したものを加え、水を加えて 1L とし、冷却したものをを用いた。
- ⑤ 0.01%*p*-ジメチルアミノベンジリデンローダニン溶液：*p*-ジメチルアミノベンジリデンローダニン 0.02g をアセトンに溶かして 100mL としたものをを用いた。
- ⑥ 4%水酸化ナトリウム：水酸化ナトリウム 4g を水に溶かして 100mL としたものをを用いた。
- ⑦ CN 標準原液(濃度 $C \approx 1\text{mgCN/mL}$)：シアン化カリウム 2.51g を正確にとり、冷却水で溶解して約 1L としたものをを用いた。本液 100mL に 4%水酸化ナトリウム 0.5mL 及び 0.01%*p*-ジメチルアミノベンジリデンローダニン溶液 0.5mL を加え、0.1mol/L 硝酸銀溶液(ファクター f_1)が赤色を呈するまで滴定し(滴定量 a mL)、濃度 C (mgCN/mL) を $C = 5.204 \times a \times f_1 \div 100$ より算出した。
- ⑧ CN 標準液(2mgCN/L)：CN 標準原液を $100/C$ μL とり、冷却水を用いて正確に 50mL としたものをを用いた。
- ⑨ チオシアン酸イオン(SCN⁻)標準液(2mgCN/L)：0.1mol/L チオシアン酸カリウム溶液(ファクター f_2)を、 $76.87/f_2$ μL とり、冷却水を用いて正確に 100mL としたものをを用いた。
- ⑩ クロラミン T 溶液：クロラミン T(三水塩) 1.25g を水で溶かして 100mL としたものをを用いた。

用いた。

(それぞれ 0.005、0.010、0.015 及び 0.020mgCN/L に相当)。

2-3 装置及び分析条件

(1) 4-PP 変法分光測定条件

装置：日立ハイテクノロジーズ(株)製ダブル
ビーム分光光度計 U-2900
光路長：50mm
測定波長：638nm

(2) IC 法測定条件

装置：サーモフィッシャーサイエンティフィック(株)製ダイオネクス ICS-2100
カラム：IonPac AG11-HC(ガードカラム)、
IonPac AS11-HC
溶離液：A … 超純水 B … OH(KOH)
溶離液グラジエント：表 1 のとおり
溶離液流量：1.0mL/分
カラム温度：35℃
検出器：電気伝導度検出器(サプレッサ型)
サプレッサ条件：35℃、198mA、CR-TR：ON
注入量：250 μL

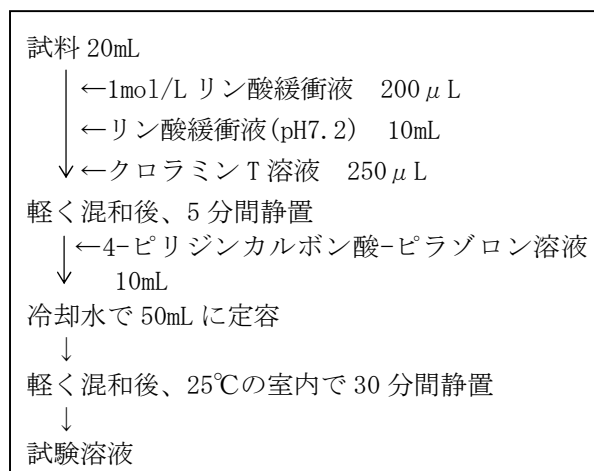


図 1 4-PP 変法測定溶液調製フロー図

4-PP 変法では、測定値は CN⁻、ClCN 及び SCN⁻の総和として算出されるため、MW 類の成分規格項目である CN⁻及び ClCN の和を算出するためには、SCN⁻の濃度を差し引く必要がある(図 2)。

なお、図 1 のフロー図からクロラミン T の添加操作を省くことで、ClCN のみの測定が可能である。

表 1 グラジエント条件

時間(分)	OH 濃度 (mM)
0	1.5
1	1.5
4	50
10	80
16	90
18	10
19	1.5
25	1.5 (postrun)

2-4 試験溶液及び標準液の調製

(1) 4-PP 変法(CN⁻、ClCN 及び SCN⁻)

4-PP 変法の測定溶液調製フローは図 1 のとおり。標準液は、試料の代わりに、希釈水約 20mL と CN⁻標準液(2mgCN/L)を 50、100、150 及び 200 μL とつて加えたものについて、同様に操作して調製した

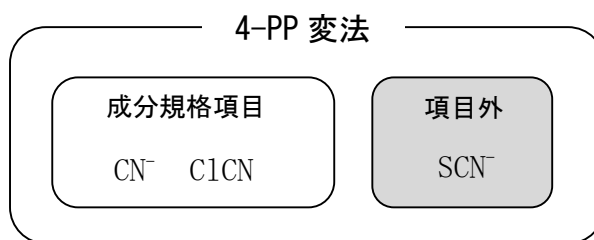


図 2 4-PP 変法によるシアン測定の模式図

(2) IC 法(SCN⁻)

試料を直接イオンクロマトグラフに注入して、試料中の SCN⁻の濃度をシアン濃度(mgCN/L)として測定した。標準液は、SCN⁻標準液を適宜希釈して 0.005、0.010、0.015 及び 0.020mgCN/L に調製したものをを用いた。

(3) CN⁻及び ClCN 濃度の算出

4-PP 変法の結果(CN⁻、ClCN 及び SCN⁻の総和)か

ら IC 法の結果(SCN⁻)を差引き、CN⁻及び C1CN の濃度(mgCN/L)を算出した。

2-5 妥当性確認の方法

妥当性確認はガイドラインに基づき、ブランク試料に CN⁻を基準値(0.010mgCN/L)相当及び定量妨害物質として SCN⁻を 0.005mgCN/L 相当添加して実施した。実験計画は、分析者 5 名が、それぞれ添加試料を 1 日 2 回、1 日間分析する方法とした。測定値から性能パラメータを推定し、表 2 に示す性能パラメータの目標値と比較して評価を行った。また、ブランク試料の測定結果から選択性を評価した。

表 2 シアン類分析法の性能パラメータ目標値

性能パラメータ名	目標値
真度(%)	90~110
併行精度(RSD%)	5>
室内精度(RSD%)	5>
選択性	誤差信号が基準値相当信号の 1/10 未満

3. 結 果

3-1 分析法の検討

(1) 4-PP 変法について

4-PP 変法の検量線は $R^2 > 0.999$ と良好な直線性を示した(図 3)。

また、ブランク試料及び超純水を用いて操作した際に得られる吸光度はいずれも約 0.002 程度であり、基準値(0.010mgCN/L)相当の標準液から得られる値(約 0.084)と比較して十分に小さく、選択性は良好であった。

上水試験方法からの変更点は以下のとおり。

- ① CN⁻標準品の希釈はアルカリや酒石酸緩衝液を用いず、冷却水のみで行うこととした。これは、アルカリ条件下では塩化シアンが不安定となること、酒石酸緩衝液を用いた場合はアンモニア存在下条件でクロラミン T の作

用により C1CN を生成することが知られている⁵⁾ためである。

- ② 発色操作において、試料中のシアン類の安定化のため、1mol/L リン酸緩衝液 200 μ L を加えることとした。
- ③ 試験操作の簡便性から、発色条件は 25°C の水中ではなく 25°C の室内とした。

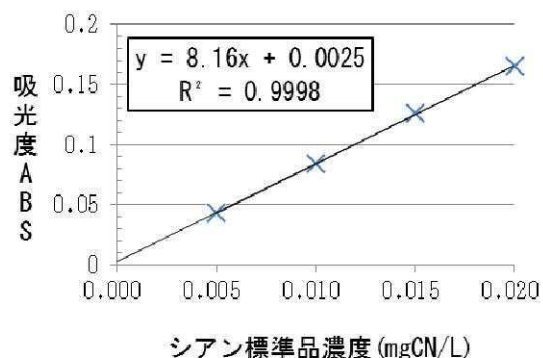


図 3 4-PP 変法検量線

(2) IC 法について

SCN⁻は、試験溶液から煮沸により CN⁻及び C1CN を除いた後、4-PP 法で測定する方法⁴⁾があるが、試験操作が煩雑で、測定に時間を要することなどから、IC 法により直接 SCN⁻濃度を定量することとした。代表的なクロマトグラムを図 4、図 5 及び図 6 に示す。IC 法の検量線は $R^2 > 0.999$ と良好な直線性を示した(図 7)。

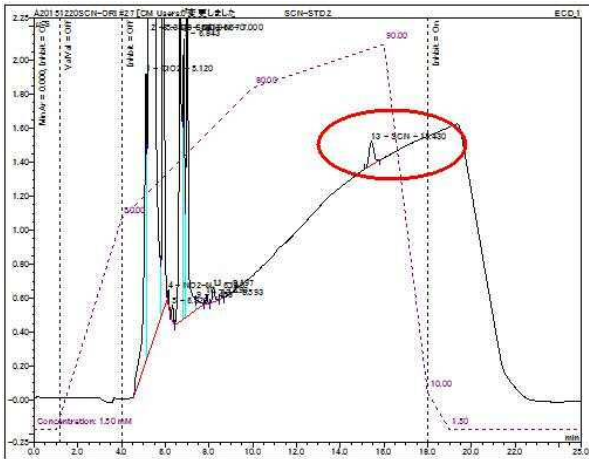


図4 IC法クロマトグラム(SCN 0.010mgCN/L 標準品)

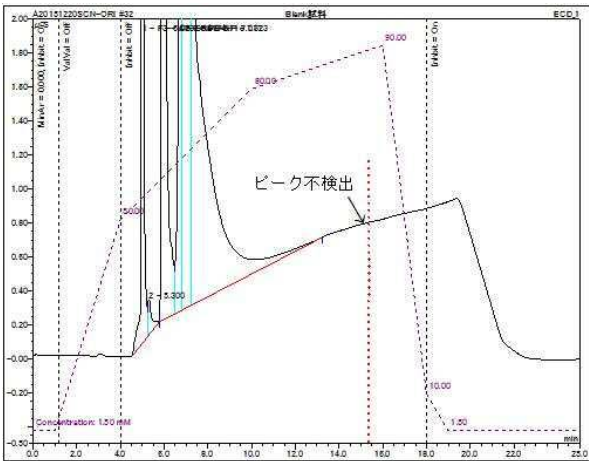


図5 IC法クロマトグラム(ブランク試料)

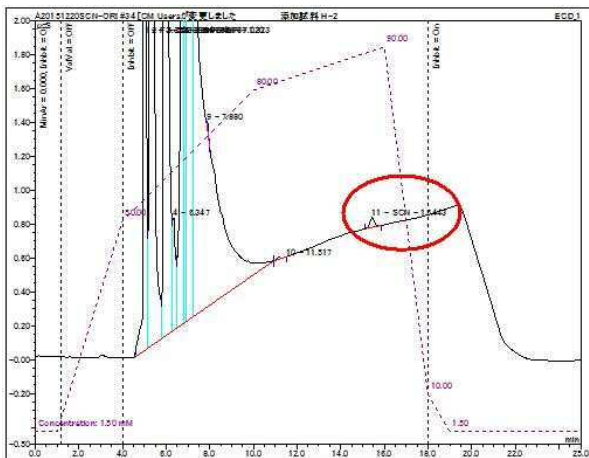


図6 IC法クロマトグラム(添加試料、SCN 0.005mgCN/L 含有)

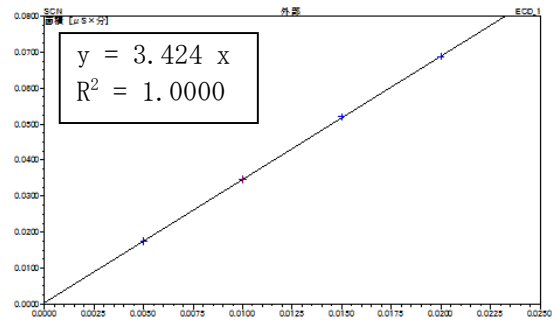


図7 IC法検量線

3-2 妥当性確認結果

併用法を妥当性確認した結果、全ての性能パラメータが目標値(表2)を満足した。推定された性能パラメータは表3のとおり。

表3 併用法の妥当性確認結果

性能パラメータ名	結果
真度(%)	99.0
併行精度(RSD%)	1.0
室内精度(RSD%)	1.8
選択性	良好

4. 考 察

4-1 SCN測定におけるIC法の導入について

4-PP法と比較し、IC法で必要な試験操作は標準液の希釈のみであり、操作が簡便であること、分析に要する時間が少ないことなどが利点である。また、全シアン測定及びSCN測定の分担により、検査結果を得るまでの時間を短縮することが可能である。

4-2 IC法の分析条件について

本分析に用いるイオンクロマトグラフは所内の他検査部門が日常的分析業務で用いる分析機器である。MW類で用いる分析条件を同部門の日常的な分析条件と揃えることで、分析条件の変更に伴う日常的分析業務への影響の低減及び条件の変更に伴う機器の設定変更等に係る負担軽減を図った。

また、分析条件を揃えることで、同係で得た分析上の知見をMW類の分析においても応用できるという利点がある。

4-3 分析機器の保守管理体制について

併用法で使用する機器(いずれも所内の他検査部門にて管理)については、当係と所内の他検査部門で協議した上で、食品 GLP に基づき保守管理標準作業書を定めて適切に管理できる体制を整えることで、食品検査業務で使用できるようにした。

5. 結 語

MW 類中の CN 及び C1CN について、4-PP 変法と IC 法の併用法を検討した。併用法をガイドラインに従って妥当性確認したところ、全ての性能パラメータがガイドラインの目標値を満たした。併用法によることで、当所にて整備している機器により MW 類中の CN 及び C1CN を検査することが可能となった。

併用法は、平成 28 年度から収去検査に用いる分析法として実用化する予定である。

6. 文 献

- 1) 厚生労働省：平成 26 年 12 月 22 日付け食安発 1222 第 1 号医薬食品局食品安全部長通知「乳及び製品の成分規格等に関する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について」
- 2) 厚生労働省：平成 26 年 12 月 22 日付け食安発 1222 第 4 号医薬食品局食品安全部長通知「清涼飲料水等の規格基準の一部改正に係る試験法について」
- 3) 厚生労働省：平成 26 年 12 月 22 日付け食安発 1222 第 7 号医薬食品局食品安全部長通知 食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドラインについて
- 4) 日本水道協会：上水試験方法(2011 年版) III. 金属類(無機物部会) 15. シアン
- 5) 吉川循江, 田中礼子, 荒井桂子 他：上水中の塩化シアン定量における酒石酸緩衝液の影響,

分析化学, 56(7), 593-599, 2007

- 6) 伊藤純子, 神尾典子, 大野金男：玄米中のカドミウムの試験法について, 福岡県衛生研究所年報, 28, 77-80, 2010